



P/741-177

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of

Han-Chung WU et al.

Date: May 13, 2004

Serial No.: 10/796,892

Group Art Unit: 1646

Filed: March 9, 2004

Confirmation No.: 2636

For: PEPTIDE MARKER TARGETING TO NASOPHARYNGEAL CARCINOMA CELL
AND APPLICATION THEREOF

Commissioner for Patents

P.O. Box 1450

Arlington, V 22313-1450

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

Sir:

In accordance with 35 U.S.C. §119, Applicant confirms the prior request for priority under the International Convention and submits herewith a certified copy of the following document in support of the claim:

TAIWAN PATENT APPLICATION NO. 092117944 FILED JULY 1, 2003

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as First Class Mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on May 13, 2004:

Robert C. Faber

Name of applicant, assignee or
Registered Representative

Signature

May 13, 2004

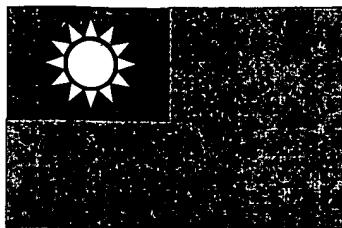
Date of Signature

RCF:db/enc.

Respectfully submitted,

Robert C. Faber

Registration No.: 24,322
OSTROLENK, FABER, GERB & SOFFEN, LLP
1180 Avenue of the Americas
New York, New York 10036-8403
Telephone: (212) 382-0700



中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS
REPUBLIC OF CHINA

茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，
其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this
office of the application as originally filed which is identified hereunder:

申 請 日：西元 2003 年 07 月 01 日
Application Date

申 請 案 號：092117944
Application No.

申 請 人：吳漢忠
Applicant(s)

局 長
Director General

蔡 練 生

發文日期：西元 2004 年 1 月 28 日
Issue Date

發文字號：09320071250
Serial No.

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：

※ 申請日期：

※IPC 分類：

壹、發明名稱：(中文/英文)

一種鼻咽癌細胞的標記胜肽

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

吳漢忠 / Han-Chung Wu

代表人：(中文/英文)

住居所或營業所地址：(中文/英文)

台北市 105 松山區新東街 66 巷 12 號 5 樓

國 稷：(中文/英文) 中華民國 / ROC

參、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

吳漢忠 / Han-Chung Wu H121662660

林欽塘 / Chin-Tarng Lin K100479596

李冬陽 / Tong-Young Lee A123871348

住居所地址：(中文/英文)

1. 台北市 105 松山區新東街 66 巷 12 號 5 樓

2. 台北市 106 大安區青田街 7 巷 7 之 1 號 6 樓

3. 台北市 108 萬華區青年路 30 巷 3 樓 12 樓之 1

國 稷：(中文/英文) 1~3. 中華民國 / ROC

伍、中文發明摘要：

本發明係提供一種鼻咽癌 (Nasopharyngeal carcinoma, NPC) 細胞的標記勝肽。此一標記勝肽具有與鼻咽癌細胞表面專一性結合的能力，當與化學治療藥物連結後，其可用於引導化學治療藥物至腫瘤細胞，將腫瘤細胞殺死，而不致因施予化學治療藥物而傷害到其他正常組織及器官。又此一標記勝肽可專一性的與鼻咽癌細胞結合，因此該標記勝肽亦可被應用於作為開發鼻咽癌檢驗試劑用。

陸、英文發明摘要：

柒、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第（六）圖。

(二) 本代表圖之元件代表符號簡單說明：

無

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

玖、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關於一種鼻咽癌細胞的標記勝肽。該標記勝肽可被應用於做為治療癌症的化學治療藥劑引導者，使該化學治療藥劑可準確被送至鼻咽癌細胞。

【先前技術】

對於住在南中國、台灣及新加坡的人來說，鼻咽癌 (Nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是一種極為常見的癌症。其病因目前仍不甚清楚，除了遺傳及其他環境因素外，其他如食用鹹魚與中草藥，以及長時間暴露於硫酸蒸氣中，皆被懷疑與鼻咽癌的發生有關。此外，EB 病毒亦被認為與鼻咽癌的發生有密切的關係。

儘管放射線療法 (radiotherapy)、手術移除 (surgical removal) 及化學療法 (chemotherapy)，已被應用於鼻咽癌治療上有三十年以上的時間，且在一些大型醫院對局部性鼻咽癌晚期病例治療中，五年存活率已改善至 90% 以上。然而在一些比較病例上，其五年存活率仍低於 50%。因此，為了有效的控制鼻咽癌，需找尋並使用其他更有效的方法來進行，例如高劑量的化學療法加上注射骨髓幹細胞 (bone marrow stem cell) 或是標的治療法 (targeting therapy)。

由於大部分的癌細胞通常與其原來的正常宿主細胞具有許多共同的特徵，這使得癌細胞因缺乏其特有的分子

標的(molecular targets)，因此毒性較高的抗癌化學治療劑，便常無法被應用於癌症的治療。大部分的抗癌化學治療劑，包含阿霉素(doxorubicin)，被選用於對抗癌細胞時，亦同時會導致正常組織，例如骨髓、胃腸道及毛囊(hair follicles)的毒性增加。由於抗癌化學治療劑會對於正常組織產生毒性的副作用，致使其於施用時必須使用低於較適當值的劑量，來避免正常器官的毒害反應，但這卻常會使得最後的治療不佳，甚至導致失敗。因此，即有人提出配位標的(ligand-targeted)的治療法，將化學治療藥劑直接引導至癌細胞處進行治療，以提供一種專一性的腫瘤治療方式。如此可限制毒性治療劑對人體的影響範圍，而藉此可提供一種新的癌症治療方法。

另外，習知的化學療法常會受限於對於正常細胞的毒性。因此若該藥劑可直接引導至腫瘤處，且遠離敏感的正常組織時，此治療結果將會有大幅的改善。大部分的小分子化學治療劑，一般來說皆具有大的散佈體積，但此一現象卻常使得在正常組織處因此而累積高的毒性劑量，而使得治療效果不佳，甚至產生反效果。

為此，即有人提出，將小分子的藥物透過大分子載體加以包裝[例如，微脂體(liposome)]，即可顯著的減少散佈的體積，且可增加腫瘤處的藥物濃度。由此可使得藥物的使用劑量降低，同時非專一性毒性的數量及種類亦會跟著減少，且增加有效遞送至腫瘤的藥劑劑量。

此外，微脂體亦可保護藥物在血漿運送的過程中不

易被代謝及失活；且由於大分子傳輸或搬運穿越健康的內皮細胞，會因其體積的限制而使得藥物在健康組織的累積減少。微脂體於生理溫度(37°C)下具有一對兩性及高水溶性分子相對上較不易通透的脂膜。此一特徵對於保持微脂體藥物於血漿中或儲存時，藥物功效的穩定性來說是很重要的。微脂體亦存在一內部的水性空間，其可被用於捕捉多種的化學治療藥劑，如阿霉素(doxorubicin)或診斷染劑。

免疫微脂體(Immunoliposomes)是一個好的載體，可用於專一性部位的藥物遞送。早期微脂體由於會快速的被網狀內皮系統(reticuloendothelial system)自血液循環中移除，因此會阻止微脂體到達標的部位。為解決此一問題，即有人提出將微脂體與多種聚乙二醇結合成包含多種聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)脂質的衍生物，其可改善循環時間及腫瘤定位。

惟前述各種習知的改善化學治療藥劑遞送至腫瘤細胞之方法中，雖或多或少有助於改善化學治療藥劑對於其他正常器官的毒害，但實際臨床上的效果仍不佳。因此現在於癌症標的治療上最重要的便是，鑑定出可用於腫瘤標記及與腫瘤相關的配位體。其可提供腫瘤專一性辨識並限制毒性影響的範圍。

【發明內容】

本發明之目的係提供一種可與鼻咽癌細胞表面特異性配位體結合的標記勝肽，藉由應用此標記勝肽，使其與化學治療藥劑連結，可將該化學治療藥劑有效且準確的遞送至癌細胞，以改善化學藥物治療的結果，並可降低化學藥物治療的劑量。

本發明之另一目的，即藉由根據本發明所指出之標記勝肽，以供作為研製鼻咽癌早期篩檢的檢驗試劑。

為達成本發明之目的，本發明係藉由習知的噬菌體顯現(phage-display)技術，以鼻咽癌細胞株(cell line)來鑑定並篩選出可與其細胞表面專一性結合的噬菌體。經數次的篩選(biopanning)後，可篩選分離出與鼻咽癌細胞株(cell line)具有高度專一性結合的噬菌體殖株。之後將此候選噬菌體殖株藉由 GCG 軟體對插入之顯現勝肽定序並進行排列分析，並自其中挑選出一具有與鼻咽癌細胞專一性結合能力的標的勝肽，在此稱為 L-勝肽。

為證實所篩選出來之候選噬菌體殖株可與鼻咽癌細胞專一性的結合係由於所插入之顯現勝肽來控制，因此使用合成的 L-勝肽(SEQ ID NO: 1)與 L-噬菌體來共同競爭鼻咽癌細胞上相同的結合位置。結果顯示，L-勝肽可以抑制 L-噬菌體結合於鼻咽癌細胞的表面。此結果意味著，L-噬菌體係藉由顯現勝肽(SEQ ID NO: 1)與鼻咽癌細胞反應，而非噬菌體本身或是此噬菌體的其他部位。

儘管 L-噬菌體可專一性的與鼻咽癌細胞結合，但是

如要將其用於製備診斷試劑或其他的應用上，仍具有一些限制。因此，發明人合成相同序列的勝肽，用以模仿噬菌體結合的活性。並藉由標示有生物素的 L-勝肽於活體外(*in vitro*)以免疫組織化學法來確認其結合活性。結果顯示，L-勝肽可結合至鼻咽癌細胞株，且酵素連結免疫吸附分析(ELISA)亦顯示標記生物素的 L-勝肽可結合至鼻咽癌細胞，且有劑量依存關係，而控制組勝肽則不會與鼻咽癌細胞反應。這些結果皆支持了噬菌體顯現的 L-勝肽是一種可適用於鼻咽癌化學治療之標記導引。

此外，由於所有的化學治療劑對人體正常組織及細胞皆具有極高的毒性，若直接注入體內將會危及正常的細胞。因此，為避免此一情形，一般會將化學治療劑與微脂體結合，藉由微脂體來包覆化學治療劑，以降低化學治療劑對人體正常組織的傷害。此外，對於作為藥物遞送使用來說，能否轉位(translocation)穿越細胞膜是很重要的，因此勝肽可否被包入細胞內是本發明的重點。

為確認前述所指出之 L-勝肽於結合微脂體後，依然能專一性的與鼻咽癌細胞的配位體結合，因此本發明中藉由習知的技術將 L-勝肽與微脂體結合，來進行檢測其結合活性。結果顯示，L-勝肽-微脂體(後面以 L-peptide-Lipo 簡稱)亦可專一性結合至鼻咽癌細胞表面，且可經由細胞之胞飲作用進入腫瘤細胞的胞質中。

接著再於微脂體中填入化學治療藥物，例如阿霉素(doxorubicin)，以製成 L-勝肽-微脂體-阿霉素的複合體(後

面以 L-peptide-Lipo-Dox 簡稱)，同樣以上述實驗進行測試。結果發現 L-peptide-Lipo-Dox 較微脂體-阿霉素複合體(後面以 Lipo-Dox 簡稱)對於鼻咽癌細胞有較高的毒性。此結果意味著，L-peptide 可引導 Lipo-Dox 至鼻咽癌細胞上。

另外，為測試 L-peptide-Lipo-Dox 於活體內(*in vivo*)的反應，再藉由將鼻咽癌細胞注射至 SCID 小鼠體內，以建立帶有鼻咽癌腫瘤模式的老鼠。藉由使用此一動物模式可以測試出 L-勝肽是否於活體內時仍可專一性的結合至腫瘤。結果顯示異種移植(xenograft)組織較其他器官(如心臟、肺及腦)含有較高的 L 噬菌體濃度，此意味著 L 噬菌體具有較高的親和性與腫瘤組織結合能力，而其他正常器官則不會與 L-噬菌體結合。此外，從 L-噬菌體的免疫組織化學法定位亦顯示 L-噬菌體僅侷限於腫瘤中，而不存在於腦、肺及心臟中。此結果亦支持 L-噬菌體可專一性結合至異種移植的腫瘤細胞上，而不會結合至正常組織及細胞的結論。

當我們應用 L-peptide-Lipo-Dox 作為治療實驗，結果發現其顯著的增強於鼻咽癌異種移植動物模式中的治療效果。當比較 L-peptide-Lipo-Dox 及 Lipo-Dox 對於腫瘤生長的影響時，結果發現經此二者處理後於腫瘤的大小及腫瘤的重量上皆有明顯的不同，特別是在多次劑量處理組經 48 天 ($P < 0.001$) 後。於整個實驗過程中，以 L-peptide-Lipo-Dox 進行處理的小鼠體重，比以 Lipo-Dox 處理者所產生之副作用較少，所有的小鼠均具有正常的體

重，且他們的器官皆未發生變異。

綜如上所述，本發明藉由使用噬菌體顯現勝肽庫來篩選位於鼻咽癌細胞表面上的結合活性後，鑑定出一新穎性的 L-勝肽，其不論於活體外或活體內皆可專一性的結合至鼻咽癌細胞表面。此外，將此勝肽被連結至包含有阿霉素的微脂體上後，其亦可專一性的引導 Lipo-Dox 至鼻咽癌腫瘤細胞的表面，於活體內殺死鼻咽癌腫瘤細胞而不致產生其他的副作用。因此，此 L-勝肽是一個非常好的引導者，可用於遞送藥物至鼻咽癌細胞，且藥物劑量可減少至原來的五分之一。

本發明將藉由參考下列的實施方式做進一步的說明，這些實施方式並不限制本發明前面所揭示之內容。熟習本發明之技藝者，可做些許之改良與修飾，但仍不脫離本發明之範疇。

【實施方式】

本發明進行篩選之步驟，首先係將取自於噬菌體勝肽庫 (New England Biolabs, Inc. Beverly, MA) 之 12 個胺基酸的勝肽接在噬菌體的基因 III 上，以製備噬菌體顯現之勝肽庫。經由五回的篩選 (biopanning) 後，可篩選分離出專一性結合率較最初高 40 倍的噬菌體 (參閱第一圖)。

分別比較選自結合至鼻咽癌細胞及正常細胞的噬菌體殖株，藉由酵素連結免疫吸附分析法 (ELISA) 篩選出數株可與鼻咽癌細胞反應的噬菌體殖株，之後並進一步將其

DNA 定序。在這些篩選出的噬菌體殖株中插入的 DNA 片段係包含 36 個核苷酸，可進一步轉譯成 12 個胺基酸。藉由使用 GCG 軟體對前述經篩選得之噬菌體顯現勝肽序列進行排列分析，其中有九個具有一致的脯胺酸(Pro)殘基，這九個中有五個顯示有一致的胺基酸殘基，即白胺酸(Leu)及脯胺酸，有兩個顯示具有相同的白胺酸-脯胺酸-酪胺酸(Leu-Pro-Tyr)序列(SEQ ID NO : 2)，如表一所示。

接著使用免疫組織化學法驗證九個候選噬菌體殖株分別對於鼻咽癌細胞株、其他癌細胞株、人類鼻黏膜細胞及纖維母細胞的結合專一性。結果發現九個噬菌體殖株的細胞結合專一性差異非常的大，如表二所示。其中，以編號 1-29 (之後稱之 L-噬菌體)的噬菌體殖株與所有受測的鼻咽癌細胞株結合的專一性最佳，這些受測的鼻咽癌細胞株包含 NPC-TW 01 細胞(參閱第二圖 A)、NPC-CGBM-1 細胞(參閱第二圖 B)及其他鼻咽癌細胞株，例如 NPC-TW 03 及 04。

為進一步確認 L-噬菌體不但可專一性的結合至鼻咽癌的培養細胞株，亦可專一性的結合至鼻咽癌的切片腫瘤細胞，將 L-噬菌體進一步與鼻咽癌檢體石蠟切片一起反應。結果顯示，L-噬菌體確實可結合至鼻咽癌切片(參閱第二圖 G)上，而不會結合至其他癌細胞株，例如口腔癌細胞株(參閱第二圖 D)及子宮頸癌細胞株(參閱第二圖 E)，或與正常的鼻黏膜細胞結合(參閱第二圖 F)。但是控制組的噬菌體並不會結合至 NPC-TW 01 細胞株(參閱第二圖 C)

及鼻咽癌檢體切片的細胞上(參閱第二圖 H)。

為進一步確認 L-噬菌體中顯現勝肽的序列(SEQ ID NO: 1)的確是可與 NPC-TW 04 細胞表面反應。發明人利用生物素標記的 L-勝肽與人類癌細胞或正常細胞的專一性結合情形進行檢驗。結果顯示，鼻咽癌細胞株，包含 NPC-TW 04、07 及 NPC-CGBM-1 存在有專一性的反應產物(參閱第三圖 A、B、C：箭頭處)，顯示 L-勝肽可與鼻咽癌細胞專一性的結合。而口腔癌細胞株 SAS(第三圖 D)、正常上皮細胞(第三圖 E)，及纖維母細胞(第三圖 F)則不會與生物素標記的 L-勝肽反應。此外，生物素標記的控制組勝肽亦不具結合活性。

另外，為檢測 L-勝肽是否可被鼻咽癌細胞藉由胞飲作用使 L-勝肽進入鼻咽癌細胞內，以及是否具有結合至位於細胞膜上標的蛋白抗原決定部位的能力，在此藉由免疫螢光顯微鏡來分析 L-勝肽-微脂體與鼻咽癌細胞結合情形，以及是否能進入至鼻咽癌細胞。其係先將 NPC-TW 04 細胞與封裝有螢光試劑(HPTS)的 L-勝肽微脂體(在此簡稱 L-peptide-Lipo-HPTS)或封裝有螢光試劑(HPTS)的微脂體(在此簡稱 Lipo-HPTS)，於 4°C 或 37°C 下共同培養 90 分鐘。結果顯示，於 4°C 下經處理 90 分鐘後，螢光標示位於細胞表面(第四圖 A)，但於 37°C 下處理 90 分鐘後，螢光則會變得較亮且散佈於細胞質中並圍繞細胞核(第四圖 C)。但是在控制組 Lipo-HPTS (第四圖 B)則沒有出現螢光，Lipo-HPTS 於 37°C 會有非特異性進入細胞質，所以有

少 量 融 光 出 現 (第 四 圖 D)。這 些 數 據 強 烈 支 持 L-peptide-Lipo-HPTS 可 被 藉 由 胞 飲 作 用 進 入 細 胞 質 並 停 留 於 其 中 。

在 細 胞 毒 性 分 析 方 面 ， 將 NPC-TW 04 細 胞 以 L-peptide-Lipo-Dox 處 理 3 、 6 、 9 、 24 、 48 及 72 小 時 ， 並 以 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 分 析 其 細 胞 數 量 。 結 果 顯 示 ， 當 同 樣 以 500 ng/ml 阿 霉 素 處 理 48 小 時 後 ， L-peptide-Lipo-Dox (54 %) 較 Lipo-Dox (67 %) 對 於 NPC-TW 04 細 胞 有 較 強 的 細 胞 毒 性 。

為 確 認 活 體 中 L-噬 菌 體 的 標 記 情 形 ， 在 此 係 將 10^9 pfu L-噬 菌 體 經 由 尾 巴 靜 脈 注 射 注 入 小 鼠 體 內 ， 以 產 生 由 NPC-TW 04 細 胞 衍 生 的 肿 瘤 。 之 後 測 定 位 於 肿 瘤 塊 及 其 他 器 官 的 噬 菌 體 濃 度 。 結 果 顯 示 ， L-噬 菌 體 可 特 殊 聚 集 於 肿 瘤 塊 中 ， 因 其 位 於 肿 瘤 塊 的 濃 度 較 其 他 器 官 (包 含 腦 、 肺 及 心 臟) 高 約 十 倍 (第 五 圖 A) ， 而 其 他 不 相 關 的 噬 菌 體 (R3-17) 或 控 制 組 的 噬 菌 體 則 顯 示 不 具 特 殊 聚 集 於 肿 瘤 塊 的 能 力 。 另 由 結 果 中 可 知 ， 與 L-噬 菌 體 同 時 注 入 的 合 成 游 離 L-勝 肽 ， 會 減 少 自 肿 瘤 塊 回 收 L-噬 菌 體 的 數 量 ， 因 此 L-噬 菌 體 對 肿 瘤 導 向 亦 會 專 一 性 的 被 L-勝 肽 所 抑 制 。 (第 五 圖 B)

為 進 一 步 確 認 鼻 咽 癌 肿 瘤 引 導 胜 肽 (L-勝 肽) 可 被 用 於 改 善 癌 症 化 學 治 療 的 治 療 效 果 。 在 此 亦 將 其 與 阿 黴 素 結 合 後 注 入 如 前 所 述 步 驟 準 備 的 SCID 小 鼠 動 物 模 式 。

經過十天後，小鼠會長出大小相當於由 NPC-TW 04 細胞所形成的腫瘤(約 50 mm^3)，之後隨機安排至不同的處理組(4~9 隻/組)。分別注入 L-peptide-Lipo-Dox 及 Lipo-Dox 或磷酸鹽緩衝液(PBS)一次。

使用 L-peptide-Lipo-Dox 處理組，其腫瘤的大小會逐漸變小，且顯著的較 Lipo-Dox 組及 PBS 組為小($p < 0.05$)。而 L-peptide-Lipo-Dox 處理組其腫瘤重量也有顯著的下降。

另以多次給藥方式，將藥劑分成五次注入，使其最後注入之總阿黴素劑量為 5 mg/kg 。

結果顯示，L-peptide-Lipo-Dox 處理組其腫瘤大小顯著的較 Lipo-Dox 組及 PBS 組為小($p < 0.001$)(第六圖 A、B)。且以 L-peptide-Lipo-Dox 處理組其腫瘤塊亦呈現較小的體積及重量(第六圖 A 及 B)。這些結果支持，L-peptide-Lipo-Dox 較 Lipo-Dox 可更有效的抑制腫瘤的成長。

實施例一

於活體外藉由噬菌體顯現勝肽庫篩選(biopanning)可與鼻咽癌細胞結合的噬菌體

於本發明中係採用 12 個胺基酸長度的隨機勝肽庫進行篩選。其係將 5×10^6 鼻咽癌細胞株(NPC-TW 04)及正常鼻黏膜細胞株(NNM-13)放置於直徑 10 公分的培養盤上。於進行篩選前，先將培養液更換為含有 1% BSA 的 5 毫升

DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) 培養基，再將培養盤置於 4°C 下 30 分鐘。接著於 4°C 下培養於含有 5×10^{12} pfu 經紫外線處理失活的控制組噬菌體於 NNM-13 細胞及 NPC-TW 04 細胞。之後將 5×10^{10} pfu 的 M13 噬菌體勝肽庫 PhD-12 (New England BioLabs, MA) 加入。經以 NNM-13 細胞於 4°C 下篩除三次每次 1 小時後，再以 NPC-TW 04 細胞進行篩選。噬菌體可藉由以冷的磷酸鹽緩衝溶液(簡稱 PBS)沖洗三次後再以 2 毫升的溶解緩衝液來加以回收，在此去除可與 NNM-13 細胞結合的噬菌體。噬菌體可進一步藉由 Escherichia coli ER2537 (New England BioLabs, MA) 來增殖。將此回收的噬菌體再與 NPC-TW 04 的細胞反應進行篩選，以去除無法結合至 NPC-TW 04 細胞的噬菌體，重複此一步驟進行五回。藉此即可篩選出可與 NPC-TW 04 細胞專一性結合的候選噬菌體。

實施例二

篩選出可與鼻咽癌細胞反應的噬菌體殖株及 DNA 定序

將 NPC-TW 04 細胞塗佈於 96 孔的酵素連結免疫吸附分析(ELISA)盤上過夜，以不含血清的 DMEM 清洗兩次，再以阻隔緩衝液(blocking buffer，含有 1% BSA 的不含血清 DMEM)於 37°C 下反應 30 分鐘。

取實施例一中篩選出的噬菌體 10^9 pfu 加入上述培養盤中，於 4°C 下培養 2 小時。之後再以冷的 PBS 及以阻隔緩衝液稀釋成 1:1000 的結合辣椒根過氧化酶的抗噬菌體

M13 抗體溶液 [horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-bacteriophage M13 antibody] (Pharmacia, Sweden) 沖洗三次，於 4°C 下培養 1 小時。

以冷的磷酸鹽緩衝溶液沖洗三次，再以過氧化酵素基質鄰-苯二胺二鹽酸鹽 (o-phenylenediamine dihydrochloride, Sigma, Germany) 進行培養。最後加入 3N HCl 中止反應，以酵素連結免疫吸附分析讀取儀測定 490nm 的吸光率 (absorbance)，自其中篩選出與鼻咽癌細胞專一性結合較高者。

將前述所挑出之噬菌體殖株，經增殖後以 1/6 體積比的聚乙二醇/氯化鈉 [20% (w/v) PEG-8000 and 2.5 M NaCl] 沉澱。將此沉澱之噬菌體顆粒 (phage pellet) 再懸浮於 100μl 碘化物緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 4 M NaI) 中，加入 250 μl 乙醇，並於室溫下培養 10 分鐘。

之後以 12,000×g 離心 10 分鐘，以使噬菌體之 DNA 自噬菌體顆粒中分離出來，以 70% 乙醇清洗後，經乾燥，再溶解於 50μl 的蒸餾水中。

此純化的噬菌體株，其 DNA 序列可使用自動 DNA 定序儀 (ABI PRISM 377, Perkin-Elmer, CA, USA)，以雙去氧核糖核酸鏈停止法 (dideoxynucleotide chain termination method) 來定序。噬菌體的顯現勝肽序列再藉由 GCG 程式轉譯及排序。

在這些篩選出的噬菌體殖株中插入的 DNA 片段係包含 36 個核苷酸，其可轉譯成 12 個胺基酸。藉由使用 GCG

軟體對噬菌體顯現胜肽序列進行排列比對後，發現其中有九個顯現胜肽皆具有一樣的脯胺酸(Pro)殘基。而這九個中有五個存在有相同的胺基酸殘基序列，白胺酸(Leu)及脯胺酸，有兩個顯示具有相同的白胺酸-脯胺酸-酪胺酸(Leu-Pro-Tyr)序列(SEQ ID NO：2)，如表一所示。

實施例三

專一性噬菌體及結合分析

將受測之癌症細胞株、正常鼻上皮細胞(nasal epithelia)及纖維母細胞(fibroblasts)塗佈在蓋玻片上，且培養至80%細胞密度(confluence)。將此蓋玻片以DMEM(無血清)培養基清洗兩次後，於4°C下培養於含有 10^{11} pfu經紫外線處理失活的控制噬菌體之阻隔緩衝液中30分鐘。之後再以PBS沖洗兩次，並以1%過氧化氫於4°C下處理10分鐘，再以冷的PBS潤洗。

取 $10^9\sim10^{10}$ pfu純化的噬菌體(包含L-噬菌體)加入每個含有阻隔緩衝液的蓋玻片上，於4°C下培養1小時。再以冷的磷酸鹽緩衝溶液清洗三次，再加入具有HRP標記以阻隔緩衝液稀釋成1/50(v/v)的老鼠抗M13單株抗體溶液，於4°C下1小時。

蓋玻片再以冷的磷酸鹽緩衝溶液清洗三次，以3%甲醛(以磷酸鹽緩衝液配製)固定後，以冷的磷酸鹽緩衝溶液潤洗兩次。將蓋玻片放入0.05%鹽酸二氨基聯苯胺(3,3'-diaminobenzidine-4 HCl, DAB solution pH 7.4)溶液

(以 0.2M Tris-HCl 緩衝液配製)中 5 分鐘，再轉移至含有 0.01%過氧化氫的鹽酸二氨基聯苯胺溶液中 40 秒，以磷酸鹽緩衝溶液清洗，最後放置於含有 50%甘油的磷酸鹽緩衝溶液中。

經測試後，前述九個候選噬菌體殖株的細胞結合專一性差異非常的大，如表二所示。其中，編號 1-29 (L-噬菌體)的噬菌體殖株有專一性，能與所有受測的鼻咽癌細胞株結合，這些受測的鼻咽癌細胞株包含 NPC-TW 01 細胞株(參閱第二圖 A)、NPC-CGBM-1 細胞株(參閱第二圖 B)及其他鼻咽癌細胞株，例如 NPC-TW 03 及 04。而其他的噬菌體殖株專一性結合的情形較 L-噬菌體差。

實施例四

標記生物素的 L-勝肽對於鼻咽癌細胞株的專一性結合

先將鼻咽癌細胞培養於蓋玻片上，再將此蓋玻片以不含血清的的 DMEM 培養基清洗兩次，之後培養於阻隔緩衝液中，於 37°C 下 30 分鐘。再以冷的 PBS 清洗兩次，並以 1%過氧化氫於 4°C 下處理 10 分鐘，及冷的 PBS 潤洗。

分別取 10 μ l 的預先標記生物素的 L-勝肽(簡稱為 Biotin-L-peptide)及預先標記生物素的控制組勝肽(簡稱為 biotin-control-peptide)加入前述的蓋玻片上，於 4°C 下維持 1 小時，並以冷的 PBS 清洗兩次。

將此蓋玻片進一步加入以阻隔緩衝液稀釋成 1:50 的山羊抗生物素抗體(Vector, CA)溶液於 4°C 下培養 1 小

時，再以冷的 PBS 清洗兩次。

加入以阻隔緩衝液稀釋成 1：100 生物素標記的 (biotinylated) 馬抗山羊抗體 (Vector, CA) 溶液，於 4°C 下培養 1 小時，再以冷的 PBS 清洗兩次。

與卵白素-生物素-或氧化酵素 (avidin-biotin-peroxidase) 複合試劑 (ABC kit. Vector, CA) 反應 30 分鐘，固定於含有 3% 仲甲醛 (paraformaldehyde) 的 PBS 中 10 分鐘，清洗並浸漬於二胺基聯苯胺 (3,3'-Diamino benzidine, DAB) 溶液中 5 分鐘，再移至含有 0.01% 過氧化氫的二胺基聯苯胺溶液中 40 秒，以 PBS 清洗並放置於含有 50% 甘油的 PBS 中。

結果顯示，鼻咽癌細胞株 (包含 NPC-TW 04、07 及 NPC-CGBM-1) 存在專一性的反應產物 (參閱第三圖 A、B、C：箭頭處)，而口腔癌細胞株 SAS (第三圖 D)、正常上皮細胞 (第三圖 E)，及纖維母細胞 (第三圖 F) 則無。亦即鼻咽癌細胞株可與有生物素標記的 L-勝肽反應，而口腔癌細胞株 SAS、正常上皮細胞及纖維母細胞則不會與其反應。

實施例五

結合微脂體的 L-勝肽之結合專一性

藉由逆相蒸發製備小的單層微脂體 (Small unilamellar vesicles)。將 EPC、膽固醇及 PEG-DSPE (含有 20% NHS-PEG3400-DSPE 或不含) 依 2：1：0.2 之比例反覆的擠壓依序通過 0.1 μm 及 0.05 μm 的聚碳酸酯過濾膜，再

將 30 mM HPTS 裝入微脂體中，再將 L-胜肽結合至微脂體上。

將鼻咽癌細胞分別於 4°C 或 37°C 與稀釋於每 100ml 培養基含有 53 μ g 胜肽之生長培養基之包裹 HPTS 的 L-胜肽微脂體 (L-peptide-Lipo-HPTS) 或微脂體 (Lipo-HPTS) 培養 90 分鐘。經處理後，將細胞以螢光染色劑 (Hoechst 33258) 染色後計數。未結合之微脂體以冷的 PBS 清洗 3 次後會被移除，再將其放置於安置溶液 (mounting solution, Vector, CA) 中。最後藉由免疫螢光顯微鏡 (Leica UM) 來分析 L-胜肽-微脂體結合及吞噬至鼻咽癌細胞內。

結果顯示，於 4°C 下經處理 90 分鐘後，螢光係位於細胞表面 (第四圖 A)。而於 37°C 下處理 90 分鐘後，則螢光會變得較亮且散佈於細胞質中，並圍繞著細胞核 (第四圖 C)。但是在 Lipo-HPTS 組 (第四圖 B, D) 却沒有螢光。這些數據強烈支持 L-peptide-Lipo-HPTS 可被藉由胞飲作用進入細胞質並停留於其中。

實施例六

取體重約 18~22 公克，8~10 週齡的 SCID 小鼠 (取自國立台灣大學醫學院動物中心)，注入 1×10^7 鼻咽癌細胞 (NPC-TW 01)。1~2 週後，老鼠會長出大小適中由鼻咽癌細胞 (NPC-TW 01) 所產生的腫瘤 (直徑約 0.5~1 公分)，自尾巴血管注入 10^9 pfu L-噬菌體或控制組噬菌體。注入 8~10 分鐘後，以乙醚 (diethyl ether) 使其麻醉。然後將老鼠灌注

50ml 的 PBS 以洗去未結合的噬菌體，並將其器官及腫瘤移除，秤重，及以 PBS-PI (蛋白酶抑制劑, Roche, Germany) (10 ml PBS/ one tablet) 清洗。將此器官及組織樣本均質，並於 37°C 下培養於 0.5ml 隔夜培養基 RE2738 細菌 40 分鐘，以沖洗專一性反應噬菌體顆粒。經沖洗後的噬菌體顆粒以 LB 培養基稀釋至 $10^2 \sim 10^6$ pfu，並放置於存在有 1mg/L IPTG/X-gel 的洋菜培養盤上。經 12~16 小時後，計算其菌落數。在勝肽抑制實驗中，係同時注入 10^9 pfu 的 L-噬菌體及 100 μ g 的 L-勝肽，控制組係使用無關的噬菌體 R3-17 (其顯現的勝肽序列为 TLATTASPDSAQ)。

結果顯示，L-噬菌體可引導至腫瘤塊，因其位於腫瘤塊的濃度較其他器官(包含腦、肺及心臟)高十倍(第五圖 A)，而其他無關的噬菌體(R3-17)或控制組的噬菌體則顯示不具導引至腫瘤塊的能力。由於與 L-噬菌體同時注入的合成游離 L-勝肽，會抑制自腫瘤塊回收 L-噬菌體量，因此 L-噬菌體的腫瘤導引亦會專一性的被配位體抑制。(第五圖 B)

實施例七

取 1×10^7 NPC-TW 01 鼻咽癌細胞注入老鼠中，10 天後老鼠會長出大小適中由鼻咽癌細胞(NPC-TW 01)所產生的腫瘤，將這些老鼠隨機安排至不同實驗組中。之後分別自老鼠尾巴一次注入(5 mg/kg)或分成五次注入(每次 1 mg/kg)含有阿黴素的 L-peptide-Lipo-Dox 或 Lipo-Dox (4-5

隻/每組)進行處理，使其注入之阿黴素總量為 5 mg/kg。控制組則注入相同體積不含有 L-peptide-Lipo-Dox 的磷酸鹽緩衝溶液(PBS)。每週測定兩次老鼠體重及腫瘤大小。腫瘤體積的計算係藉由下列公式來計算：

$$\text{腫瘤體積} = \text{長度} \times (\text{寬度})^2 \times 0.52$$

48 天後，將所有老鼠犧牲後，將其腫瘤移除並秤重之。平均腫瘤體積及腫瘤重量的差異藉由 Student's t-test 進行計算。

於一次給藥實驗中，L-peptide-Lipo-Dox 處理組的腫瘤會逐漸變小，且顯著較 Lipo-Dox 組及 PBS 組為小($p < 0.05$)。而以 L-peptide-Lipo-Dox 處理組其腫瘤重量也有顯著的下降。

在多次給藥實驗中，L-peptide-Lipo-Dox 處理組的腫瘤大小，顯著較 Lipo-Dox 組及 PBS 組為小($p < 0.001$)(第六圖 A、B)。且 L-peptide-Lipo-Dox 處理組的腫瘤塊亦呈現較小的體積及重量(表三)。這些結果顯示，L-peptide-Lipo-Dox 較 Lipo-Dox 可更有效的抑制腫瘤的成長。

表一 對由 NPC-TW04 鼻咽癌細胞篩選出的噬菌體顯現勝肽
序列之排列分析

噬菌體殖株	噬菌體顯現勝肽序列 ^a
1-19	FPSKTGAFVPFS
1-35	NNSQKPA P VSPF
1-31	TKNML S LPVGPG
1-8	RHLPTLFAPTPT
1-37	QLSPV L ARHNIS
1-39	PRGVWTTMSL P H
1-18	LPLTSLM P GLH
1-44	SVSLP Y ANLATH
1-29 (L-噬菌體)	RLLDTNRPL L PY

^a 噬菌體顯現相同的胺基酸以粗體字表示。

表二 九個候選菌體殖株對不同細胞種類的結合情形^a

	1-8	1-11	1-18	1-19	1-29	1-37	1-39	1-41	1-44	控制組 噬菌體
NPC-TW-01	+-	+	++	++	+++	+++	++	++	++	+-
NPC-TW-03	ND	ND	-	ND	++	ND	++	ND	+-	-
NPC-TW-04	++/+	++/+	+/-	+++	++	++	++	ND	+++	+-
NPC-CG-BM-1	-	ND	+/-	++	++/+	++	+++	ND	+	-

ND：未檢測；(++)：反應的數值為40~60%；(++)：反應的數值為30~40%；(++/+)：反應的數值為20~30%；(+)：反應的數值為10~20%；(+/-)：反應的數值為5~10%；(-)：反應的數值低於5%。

【圖式簡單說明】

第一圖 為藉由噬菌體顯現胜肽庫以 NPC-TW04 鼻咽癌細胞進行五回的篩選，以找出可與其專一性結合的噬菌體，每回回收之噬菌體數量分析圖。

第二圖 為候選噬菌體於鼻咽癌細胞株及其組織切片樣本上的免疫定位結果顯微照相圖。

A：以 L-噬菌體處理的 NPC-TW01 鼻咽癌細胞；

B：以 L-噬菌體處理的 NPC-BM-1 鼻咽癌細胞；

C：以控制組噬菌體處理的 NPC-TW01 鼻咽癌細胞；

D：以 L-噬菌體處理的 Ca9-22 口腔癌細胞株；

E：以 L-噬菌體處理的 CaSki 子宮頸癌細胞株；

F：以 L-噬菌體處理的正常鼻黏膜細胞；

G：結合至鼻咽癌細胞組織切片的 L-噬菌體；及

H：結合至鼻咽癌細胞組織切片的控制組噬菌體；

第三圖 為 L-胜肽於不同癌症細胞株上的免疫定位顯微照相圖。

A：NPC-TW04 鼻咽癌細胞株；

B：NPC-TW07 鼻咽癌細胞株；

C：NPC-CGBM-1 鼻咽癌細胞株；

D：口腔癌細胞株(SAS)；

E：正常鼻黏膜細胞株(NNM)；及

F：纖維母細胞株。

第四圖 為 L-胜肽-微脂體-HPTS 複合體於鼻咽癌細胞上

之免疫螢光染色顯微照相圖。

A：於 4°C 下處理 90 分鐘；

B：控制組(微脂體-HPTS 複合體)於 4°C 下處理 90 分鐘；

C：於 37°C 下處理 90 分鐘；

D：控制組於 37°C 下處理 90 分鐘。

第五圖 為自 SCID 小鼠所生成之鼻咽癌異種移植腫瘤上及正常器官中，回收的 L-噬菌體數量比較圖。

第六圖 為 SCID 小鼠所生成之鼻咽癌異種移植腫瘤以 L-勝肽-微脂體-阿黴素複合體(L-peptide-Lipo-Dox)處理後之結果統計圖。

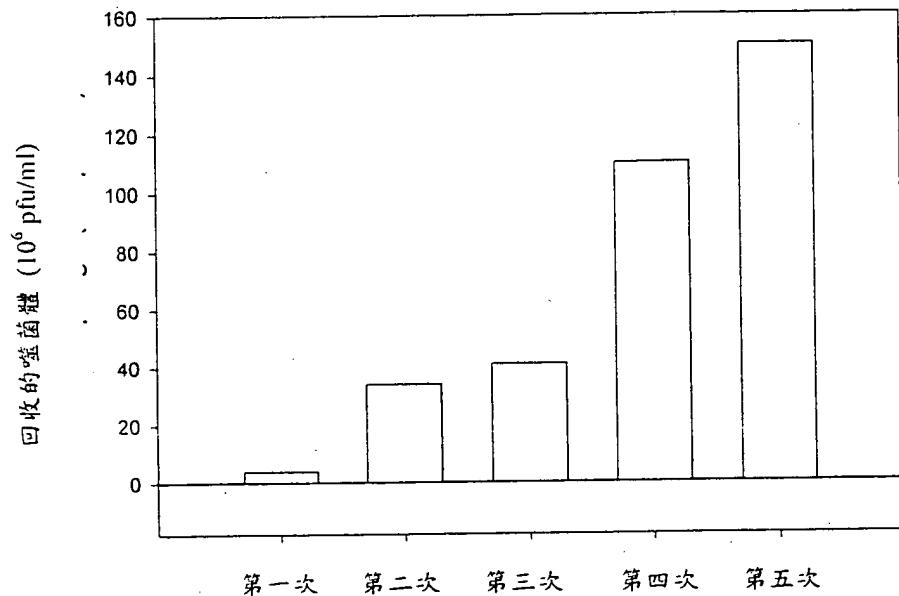
A：腫瘤大小；B：腫瘤重量。

拾、申請專利範圍：

1. 一種鼻咽癌細胞的標記勝肽，其包含一胺基酸序列，該胺基酸序列係選自 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：2 至少其中之一，該胺基酸序列能與鼻咽癌細胞表面之配位體專一性結合，而不會與正常組織細胞反應。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之標記勝肽，其中該標記勝肽與化學治療藥物連結後，具有引導該化學治療藥物至腫瘤細胞的能力。
3. 如申請專利範圍第 2 項所述之標記勝肽，其中該化學治療藥物包含阿黴素(doxorubicin)。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之標記勝肽，其中該標記勝肽與微脂體連結後，可引導該微脂體至該鼻咽癌細胞處。
5. 如申請專利範圍第 4 項所述之標記勝肽，其中該微脂體中含有該化學治療藥物。
6. 如申請專利範圍第 4 項所述之標記勝肽，其中該微脂體能經由該鼻咽癌細胞的胞飲作用進入該鼻咽癌細胞中。
7. 如申請專利範圍第 1 項所述之標記勝肽，其中該標記勝肽可應用於作為偵檢試劑的開發。
8. 一種用以殺死鼻咽癌細胞的化學治療藥物複合體，其包含一導引者，可引導該化學治療藥物至該鼻咽癌細胞表面，其中該導引者至少包含一勝肽，該勝肽至少包含一選自 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：2 至少其中之一的胺基酸序列。

9. 如申請專利範圍第 8 項所述之化學治療藥物複合體，其中該化學治療藥物複合體進一步包含一微脂體。
10. 如申請專利範圍第 8 或 9 項所述之化學治療藥物複合體，其中該化學治療藥物複合體能經由該鼻咽癌細胞的胞飲作用進入該鼻咽癌細胞中。
11. 一種核苷酸序列，其可轉譯成一胺基酸序列，該胺基序列包含 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 至少其中之一。
12. 如申請專利範圍第 11 項所述之核苷酸序列，其中該胺基酸序列可專一性的與鼻咽癌細胞表面結合。

拾壹、圖式：



第一圖

肆、聲明事項：

本案係符合專利法第二十條第一項 第一款但書或 第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

3.

4.

5.

主張國內優先權（專利法第二十五條之一）：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

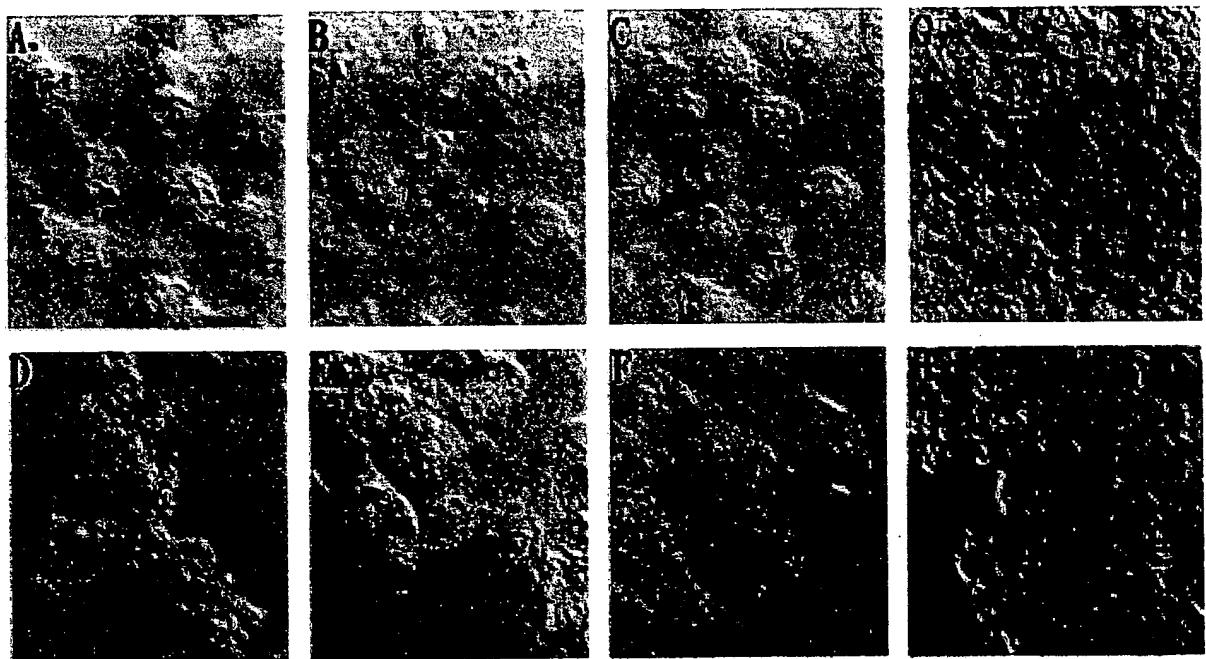
主張專利法第二十六條微生物：

國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

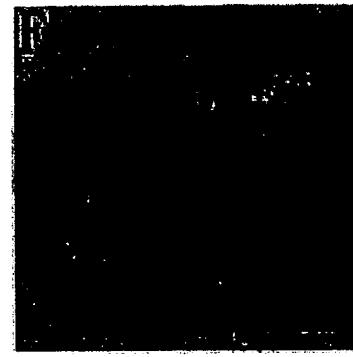
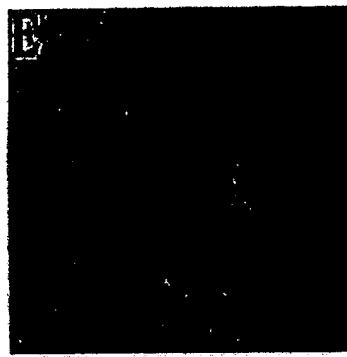
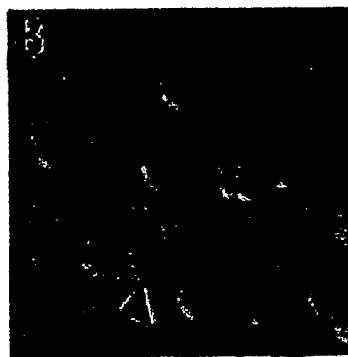
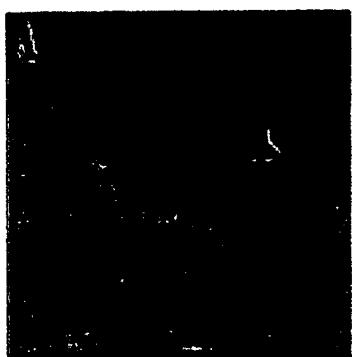
熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

BEST AVAILABLE COPY



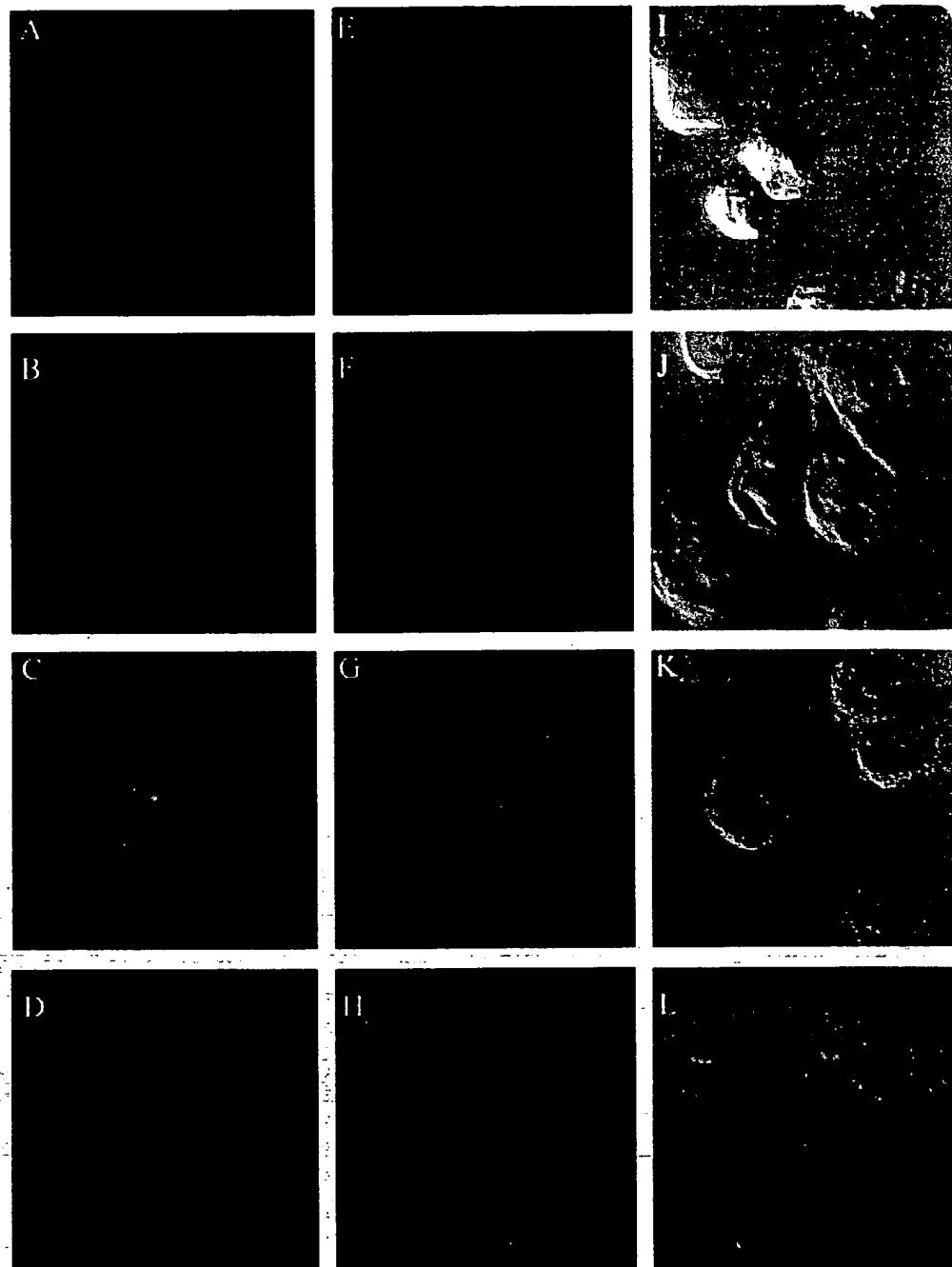
第二圖

BEST AVAILABLE COPY



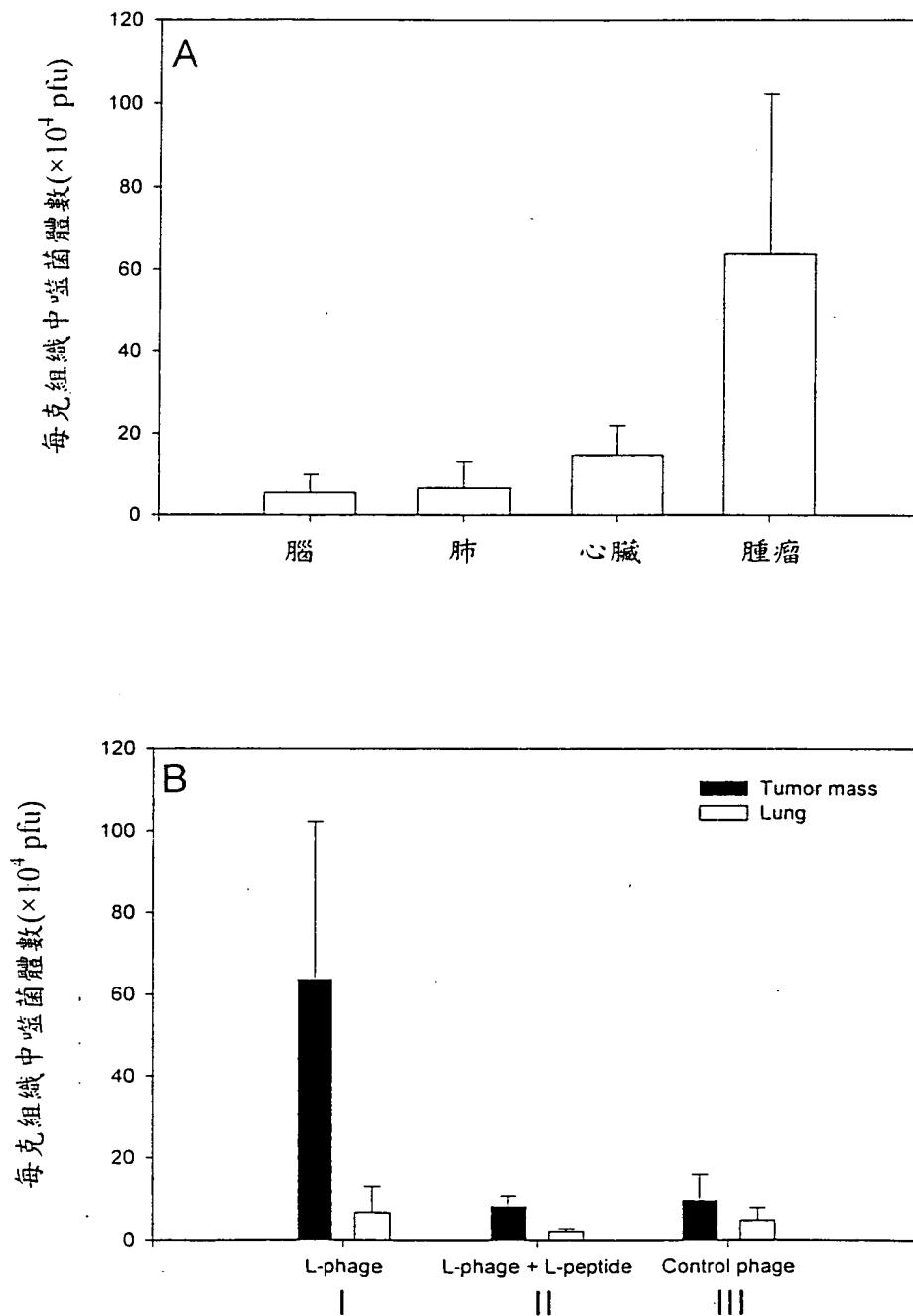
第三圖

BEST AVAILABLE COPY

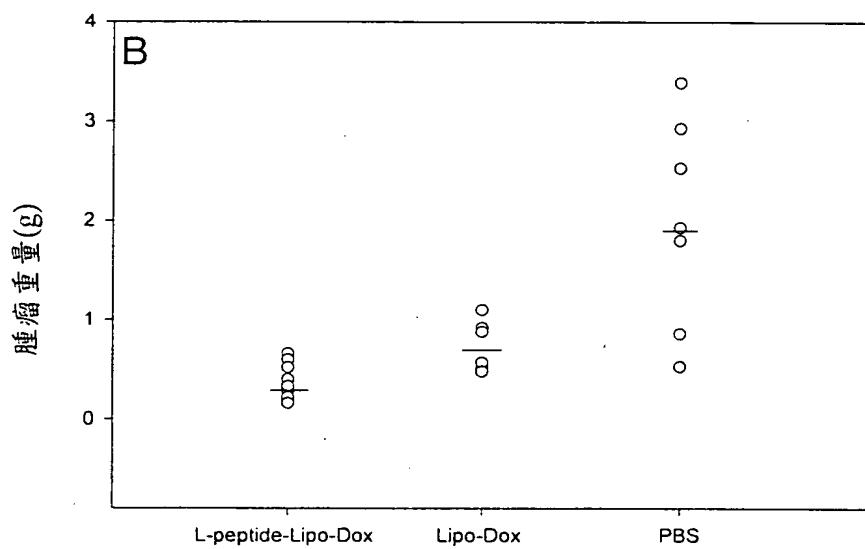
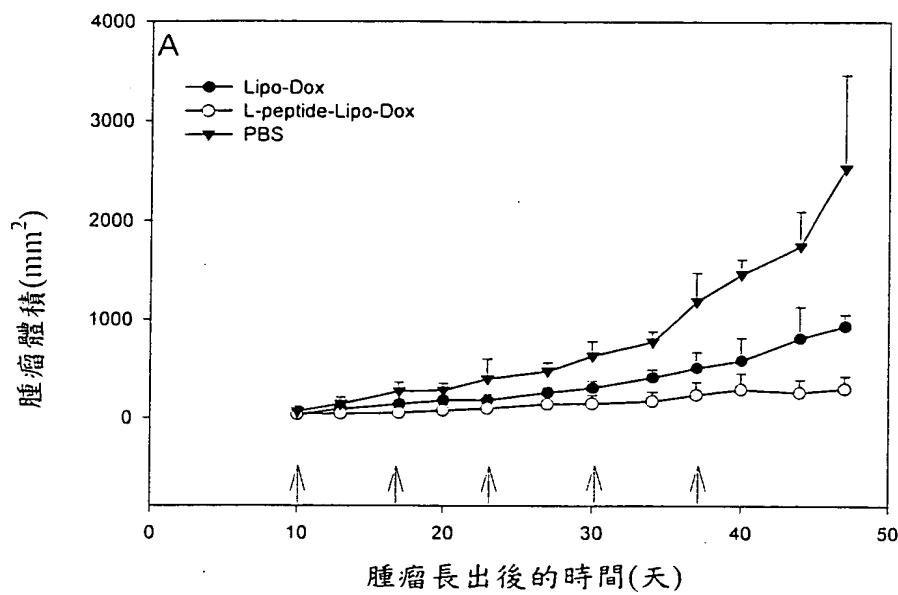


第四圖

BEST AVAILABLE COPY



第五圖



第六圖

序列表

<110>吳漢忠

<120>一種鼻咽癌細胞的標記胜肽

<160>2

<210>1

<211>12

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223>可與鼻咽癌細胞表面專一性結合之標記胜肽

<400>1

Arg Leu Leu Asp Thr Asn Arg Pro Leu Leu Pro Tyr 12

<210>2

<211>3

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>可與鼻咽癌細胞表面專一性結合之標記胜肽

<400>2

Leu Pro Tyr 3